

09/980468  
PCT/EP 00/05274

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



4

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 199 25 718.3

**Anmeldetag:** 07. Juni 1999

**Anmelder/Inhaber:** BASF Aktiengesellschaft,  
Ludwigshafen/DE

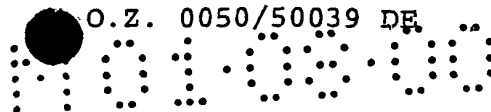
**Bezeichnung:**  $\Delta^6$ -Acetylenase und  $\Delta^6$ -Desaturase aus *Ceratodon*  
*purpureus*

**IPC:** C 07 K 14/195

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Anmeldung.

München, den 06. Juli 2000  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag

Hiebinger



## $\Delta^6$ -Acetylenase und $\Delta^6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

### Beschreibung

5

Das Enzym  $\Delta^6$ -Acetylenase führt in Fettsäurereste von Glycero-  
lipiden eine *cis*-Doppelbindung in Position C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> ein und/oder  
konvertiert eine bereits vorhandene *cis*-Doppelbindung in Position  
C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> in eine Dreifachbindung. Das Enzym  $\Delta^6$ -Desaturase führt in

10 Fettsäurereste von Glycerolipiden ausschließlich eine *cis*-Doppel-  
bindung in Position C<sub>6</sub>-C<sub>7</sub> ein. Die Erfindung betrifft neue  
 $\Delta^6$ -Acetylenasen und  $\Delta^6$ -Desaturasen, ihre Verwendung und ähnlicher  
Proteine sowie die zugehörigen kodierenden Nukleinsäuren zur  
Veränderung des Gehaltes und/oder der Struktur von Acyllipiden  
15 in  $\Delta^6$ -Position, deren Katabolite und/oder deren synthetischer  
Folgeprodukte in transgenen Zellen und/oder Organismen.

1. Isolierung und Klonierung der  $\Delta^6$ -Acetylenase und  $\Delta^6$ -Desa-  
turase aus *Ceratodon purpureus*

20

Um DNA-Sequenzen aus *Ceratodon purpureus* zu isolieren, die für  
eine  $\Delta^6$ -Acetylenase und eine  $\Delta^6$ -Desaturase kodieren, wurden ver-  
schiedene degenerierte Oligonukleotidprimer von DNA-Sequenzen  
abgeleitet, die für  $\Delta^5$ - (EMBL Accession-Nr. Z81122) und  $\Delta^6$ -Fett-  
25 säure-Desaturasen (U79010, AJ222980, AF031477 kodieren:

Primer A: 5'-TGG TGG AA(A/G) TGG A(A/C)I CA(C/T) AA-3'  
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz  
WWKW(N/T/K)H(N/K)

30

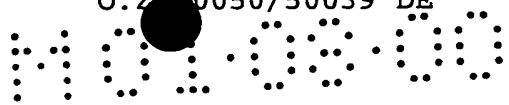
Primer B: 5'-(T/G)GI TGG AA(A/G) (T/G)(G/A)I (A/C)AI CA(C/T)  
AA-3'  
forward Primer, abgeleitet von der Aminosäuresequenz  
(G/W)WK(E/D/W)(N/Q/K)H(N/K)

35

Primer C: 5'-AT (A/T/G/C)T(T/G) (A/T/G/C)GG (A/G)AA (A/T/  
G/C)A(A/G) (A/G)TG (A/G)TG -3', reverse primer, abge-  
leitet von der Aminosäuresequenz (I/M)(H/Q/N)PF(L/F)HH

40 Mittels Polymerasekettenreaction (PCR) mit Einzelstrang-cDNA aus  
*C. purpureus* wurden mit Primer A und Primer C zwei DNA-Fragmente  
von 557 bp (Cer3) und 575 bp (Cer16) Länge und mit Primer B und  
Primer C ein DNA-Fragment von 560 bp (Cer1) Länge amplifiziert.  
Es wurde folgendes Programm für die Amplifizierung benutzt:

45 10 min bei 94°C, Pause für 'hot start' bei 72°C, gefolgt von  
32 Zyklen von 20 s bei 94°C, 1 min bei 45°C (Bindungstemperatur,  
T<sub>m</sub>) und 1 min bei 72°C, 1 Zyklus von 10 min bei 72°C und Stop bei



4°C. Für die Amplifikation wurde die *Taq*-DNA-Polymerase (Gibco BRL) verwendet.

Die o.g. doppelsträngigen DNA-Fragmente aus den zwei PCR-Amplifikationen wurden in den pGEM-T Vektor (Promega) legiert, in *E. coli* XL1blue MRF' Kan (Stratagene) transformiert und mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) sequenziert. Die DNA-Teilsequenzen von Cer1 und Cer3 zeigten 70 % Identität. Die o.g. DNA-Teilsequenzen kodierten ohne Primer für offene Leserahmen bei Cer1 von 173 Aminosäuren (Abb. 1, 2), bei Cer 3 von 172 Aminosäuren (Abb. 3, 4) und bei Cer16 von 178 Aminosäuren (Abb. 5, 6). Die abgeleitete Proteinsequenz von Cer1 wies 64 % zu Cer3 und 28 % identische Aminosäuren zu Cer16 auf; Cer 3 und Cer16 wiesen wiederum 27 % identische Aminosäuren auf.

Die höchste Ähnlichkeit der Cer1- und Cer3-Proteine besteht zu der  $\Delta^6$ -Acyl lipid-Desaturase aus *Physcomitrella patens* (Girke et al., 1998), während Cer16 die höchste Ähnlichkeit zu der  $\Delta^6$ -Acyl lipid-Desaturase und der  $\Delta^8$ -Sphingolipid-Desaturase aus höheren Pflanzen aufweist (Abb. 7).

Eine gerichtete  $\lambda$ ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* wurde von Fritz Thummler, Botanisches Institut der Universität München, zur Verfügung gestellt (Pasentsis et al., 1998). Es wurde ein PCR-Test dieser *Ceratodon*-Bank durchgeführt, bei dem spezifische Primer von den o.g. DNA-Teilsequenzen Cer1, Cer3 und Cer16 abgeleitet wurden:

Spezifische forward und reverse Primer:

Cer1: 5'-CGAATGAGTGCGACGAAC -3' + 5'-AATAACCTGGGCTCTCAC-3'  
Cer3: 5'-ATGAGGATATTGATACTCTC-3' + 5'-GCAATCTGGGCATTCACG-3'  
Cer16: 5'-GACATCAAAGCTCTTCTC-3' + 5'-GGCGATGAGAAGTGGTTC-3'

Eine Restriktionsanalyse (Hind III bzw. EcoR V) der aus der cDNA-Bank mittels PCR amplifizierten Produkte zeigte in allen drei Fällen das gleiche Restriktionsmuster wie das der PCR-Amplifikate aus der ss-cDNA, d.h. die *Ceratodon*-cDNA-Bank enthält die drei Klone Cer1, Cer3 und Cer16.

## 2. cDNA-Bank Screening und Sequenzierung der full length Klone

DNA-Minipräparationen, der drei aus ss-cDNA amplifizierten PCR-Fragmente Cer1, Cer3, Cer16 von ~570 bp Länge in pGEM-T (s.o. unter 1.) wurden für das weitere Screening der vollständigen Klone aus einer  $\lambda$  ZAP-cDNA-Bank von *Ceratodon purpureus* an M. Lee und S. Stymne abgegeben. Dieses cDNA-Bank-Screening führte bisher zu zwei vollständigen Klonen von Cer1 und Cer3 mit Inserts von ca. 2,2 kb, die als EcoR I / Kpn I-Fragmente aus dem  $\lambda$  ZAP-Vektor

in die EcoR I / Kpn I-Schnittstellen des puc19-Vektors (New England Biolabs) subkloniert und in *E. coli* JM105 transformiert wurden.

→ Ein weiteres Screening der cDNA-Bank mit Cer1 und Cer3 als Hybridisierungsproben unter niedriger Stringenz zeigte, daß mindestens ein weiterer Cer1-homologer Klon existiert, der evtl. für die  $\Delta^5$ -Desaturase kodieren könnte. → Teilsequenz bei M. Lee erfragen!

- 10 Zwei *E. coli*-Klone, Cer1-50 und Cer3-50, wurden vollständig sequenziert. Cer1-50 hat eine Länge von 2003 bp (Abb. 8) und kodiert für ein offenes Leseraster von 483 Aminosäuren (Abb. 9). Cer3-50 besitzt eine Länge von 2142 bp (Abb. 10) mit einen offenen Leserahmen von 520 Aminosäuren (Abb. 11). Beide Protein-
- 15 sequenzen weisen N-terminal das hochkonservierte HPGG-Motiv des Cytochrom  $b_5$  auf (Lederer, 1994) und C-terminal die für Desaturasen charakteristischen drei Histidin-Boxen auf (Shanklin et al., 1994). Sie stellen somit weitere Mitglieder der wachsenden Familie der Cytochrom  $b_5$ -Fusionsproteine dar (Napier et al.,
- 20 1999). Das erste Histidin der dritten Box ist gegen Glutamin ausgetauscht, einem weiteren Charakteristikum von  $\Delta^5$ - und  $\Delta^6$ -Acyl-lipid-Desaturasen sowie  $\Delta^8$ -Sphingolipid-Desaturasen.

3. Klonierung und Expression der  $\Delta^6$ -Acetylenase und der
- 25  $\Delta^6$ -Desaturase aus *Ceratodon* in *Saccharomyces cerevisiae*

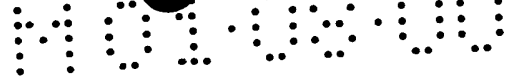
Die Klonierung und Expression von Cer1 und Cer3 erfolgte in Anlehnung an die erfolgreiche Expressionmethode des *fad2*-Gens aus *A. thaliana* (Kajiwara et al., 1996), der  $\Delta^8$ -Sphingolipid-

30 Desaturase aus *A. thaliana* und *B. napus* (Sperling et al., 1998) und der  $\Delta^5$ -Desaturase aus *Caenorhabditis elegans* (Watts and Browse, 1999) in Hefe.

Die Plasmid-DNA der o.g. vollständigen Klone Cer1 und Cer3 in puc19 (EcoR I / Kpn I) wurde mittels DNA-Minipräparation (Riggs

35 et al., 1986) aus *E. coli* JM105 isoliert. Je 40 bis 50 ng dieser Plasmid-DNA wurde zur PCR-Amplifikation (95°C 3 min, 30 Zyklen á 95°C 45 s, 56°C 30 s, 72°C 90 s, sowie 72°C 10 min und Stop bei 10°C) des offenen Leserahmens mit der *pfu*-DNA-Polymerase (Stratagene) eingesetzt. Für die gerichtete Klonierung in die Kpn I /

40 EcoR I-Schnittstellen des Hefe-Expressionsvektor pYES2 (Invitrogen) wurden der forward Primer um eine Kpn I- und der reverse Primer um eine EcoR I-Schnittstelle am 5'-Ende der codierenden Region (ATG + Stopcodon fett gedruckt) erweitert:



4

Cer1: 5'- CC GGTACC ATG GCC CTC GTT ACC GAC-3' +  
5'- CC GAATTC TTA GTG AGC GTG AAG CCG-3'

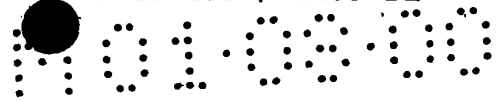
5 Cer3: 5'- CC GGTACC ATG GTG TCC CAG GGC GGC-3' +  
5'- CC GAATTC TCA ACT CGC AGC AAG CTG-3'

Mittels Agarose-TBE-Gelelektrophorese wurde die erfolgreiche PCR-Amplifikation der erwarteten DNA-Fragmente von 1468 bp (Cer1) und 1579 bp (Cer3) Länge bestätigt. Die amplifizierte DNA wurde mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (QIAGEN) aus dem TBE-Agarosegel extrahiert und mit dem Sure Clone Ligation Kit (Pharmacia) in die Sma I-Klonierungsstelle des dephosphorylierten puc 18-Vektors (Pharmacia) subkloniert. Nach Transformation in *E. coli* XL1 blue MRF' Kan (Stratagene) wurde eine DNA-Minipräparation (Riggs et al., 1986) der Ampicillin-selektierten Transformanten durchgeführt und die isolierte Plasmid-DNA mit dem ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Weiterstadt) ansequenziert. Die Sequenzdaten bestätigten die vollständige Amplifikation der offenen Leserahmen von Cer1 und Cer3. Des weiteren wurde die Plasmid-DNA mit den Restriktionsendonukleasen Kpn I und EcoR I geschnitten und die resultierenden ~1,5 kb KpnI/EcoRI-Fragmente wurden in die KpnI/EcoRI-Stelle des gezippten Hefe-*E. coli* shuttle-Expressionsvektors pYES2 (Invitrogen Co.) legiert. Die daraus resultierenden neuen Plasmide, Cer1/pYES2 und Cer3/pYES2 und wurden in *E. coli* TOP10F' (Invitrogen Co.) transformiert. Die DNA-Maxipräparationen wurden mit dem Plasmid Maxi Kit (QIAGEN) durchgeführt. Die isolierten Plasmide Cer1/pYES2 und Cer3/pYES2 wurden in *S. cerevisiae* INVSc1 (Invitrogen Co.) mit der Polyethylenglycol-Methode (Von Pein, 1992) transformiert. Die Selektion erfolgte auf Agarplatten aus komplettem Minimal-Dropout-Uracil (CM)-Medium mit 2 % Glucose (Asubel et al., 1995). Für den analytischen Vergleich der Transformanten mit dem Hefe-Wildtyp wurde auch der ungeschnittene pYES2-Vektor in INVSc1 (Kontrolle) transformiert.

35

Hefen können neben den eigenen Fettsäuren (16:0, 16:1, 18:0 und 18:1) auch exogene Fettsäuren in ihre Membranlipide inkorporieren (Bossie und Martin, 1989). Um die Substratspezifität der jeweils exprimierten Desaturase zu testen, wurde dem CM-2 % Raffinose-Medium zur Solubilisierung exogener Fettsäuren 1 % Tergitol NP-40 (w/v, Sigma) und 0,003 % der entsprechenden Fettsäure (Stamm-lösung: 0,3 % bzw. 3 % Fettsäure in 5 % Tergitol NP-40, w/v) vor der Inokulation zugegeben. Die Vorkultur erfolgte durch Inokulation von 3 ml CM-2 % Raffinose-Medium/1 % Tergitol NP-40 mit einer transgenen Hefekolonie und anschließender Inkubation für 2 d bei 30°C im Roller bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) von 4,0 bis 4,3. Für die Hauptkultur wurden 10 ml

45



CM-2 % Raffinose/1 % Tergitol NP-40-Medium  $\pm$  0,003 % Fettsäure mit einem Aliquot der Vorkultur (200 fache Verdünnung) ad OD<sub>600</sub> 0,02 angeimpft und 24 h bei 30°C, 250 rpm im Schüttler inkubiert. Die Induktion der Testkulturen erfolgte in der logarithmischen Wachstumsphase (OD<sub>600</sub> 0,5 bis 0,6) durch Zugabe von Galaktose ad 1,8 %. Die Ernte der induzierten Zellen erfolgte nach weiteren 24 h aeroben Wachstums bei 30°C bei einer OD<sub>600</sub> von 4,0 bis 4,3.

#### 4. GC-Analyse der Fettsäuremethylester aus transgenen Hefen

10

Die induzierten Hefezellen wurden durch 10 min Zentrifugation bei 2000 g geerntet, in 3 ml Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C abgekocht und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit 1 N methanolischer Schwefelsäure und

15

2 % Dimethoxypropan 1 h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) wurden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME wurden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Mono-, Di-, Tri- und Tetraensäuremethylester wurde durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt.

20

Für die Tri- und Tetraensäuren sind keine Referenzsubstanzen erhältlich. Ihre Identität und die Position der Dreifachbindung wird durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-analysiert.

25

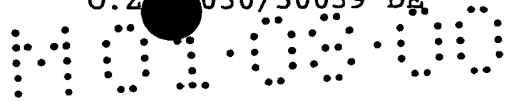
Die GC-Analysen der FAME aus den transgenen Hefen, die mit dem Leervektor pYES2, mit Cer1/pYES2 ( $\Delta^6$ -Acetylenase) und mit Cer3/pYES2 ( $\Delta^6$ -Desaturase) transformiert wurden, ist in Tab. 1 dargestellt. Die transgenen Hefezellen wurden ohne exogene Fettsäuren ( - ) oder nach Zugabe von Linolsäure (18:2),  $\gamma$ -Linolensäure ( $\gamma$ -18:3),  $\alpha$ -Linolensäure ( $\alpha$ -18:3) oder  $\omega$ 3-Octadecatetraensäure (18:4) analysiert. Dargestellt ist die Fettsäurezusammensetzung in [mol %] der Gesamtfettsäuren, wobei die Inkorporation der gefütterten Fettsäuren (schwarzer Fettdruck), die Desaturierungsprodukte (in roter Farbe) und die Summe der Desaturierungsprodukte (Fettdruck, letzte Zeile) bei den einzelnen Fütterungsversuchen angegeben sind.

35

40

Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß die Nukleotidsequenzen von Cer1 für eine  $\Delta^6$ -Acyl lipid-Acetylenase und von Cer3 für eine  $\Delta^6$ -Acyl lipid-Desaturase aus dem Moos *Ceratodon purpureus* kodieren, welche in transgenen Hefen zur Bildung neuartiger Fettsäuren (Tab.1, Zusammenfassung) führen. Fütterungsversuche mit  $\Delta^{11,14}$ -20:2 und  $\Delta^{8,11,14}$ -20:3 haben gezeigt, daß diese langkettigen

45



C<sub>20</sub>-Fettsäuren zwar inkorporiert, aber nicht in Δ<sup>6</sup>-Position von Cer1 und Cer3 desaturiert werden können. Dies deutet darauf hin, daß die Δ<sup>6</sup>-Acetylenase und die Δ<sup>6</sup>-Desaturase beide auf die Existenz einer Δ<sup>9</sup>-Doppelbindung im Fettsäuresubstrat angewiesen sind.

→ Weitere Fütterungsversuche mit Crepenynsäure (Δ<sup>9,12</sup>yn-18:1) und Vernolsäure (Δ<sup>9,12</sup>epoxy-18:1) sollen zeigen, ob auch diese Acetylen- bzw. Epoxy-Fettsäure von der Δ<sup>6</sup>-Acetylenase und/oder von der Δ<sup>6</sup>-Desaturase aus *Ceratodon purpurea* als Substrate verwendet werden.

Mit Hilfe einer Δ<sup>6</sup>-Acetylenase wurden Δ<sup>6</sup>-cis-ungesättigte Fettsäuren und Δ<sup>6</sup>-Acetylenfettsäuren hergestellt. Mit Hilfe einer Δ<sup>6</sup>-Desaturase wurden Δ<sup>6</sup>-cis-ungesättigte Fettsäuren hergestellt. Hierzu wurden die für eine Δ<sup>6</sup>-Acetylenase und eine Δ<sup>6</sup>-Desaturase codierenden Gene aus cDNA des Moores *Ceratodon purpureus* isoliert, in die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* kloniert und funktional exprimiert. Die Aktivität dieser Gene konnte *in vivo* durch die Bildung neuartiger Fettsäuren in transgenen Hefen, die mit exogenen Fettsäuren (Linol-, γ-Linolen-, α-Linolen- oder Octadecatetraensäure) als Substrate gefüttert wurden, nachgewiesen werden. Folgende Enzymaktivitäten konnten nachgewiesen werden:

Δ<sup>6</sup>-Acetylenase bzw. Δ<sup>6</sup>-Desaturase :

25	Δ <sup>9</sup> -16:1	→	Δ <sup>6,9</sup> -16:2
	Δ <sup>9</sup> -18:1	→	Δ <sup>6,9</sup> -18:2
	Δ <sup>9,12</sup> -18:2	→	Δ <sup>6,9,12</sup> -18:3
	Δ <sup>9,12,15</sup> -18:3	→	Δ <sup>6,9,12,15</sup> -18:4
	Δ <sup>6</sup> -Acetylenase: Δ <sup>6,9,12</sup> -18:3	→	Δ <sup>6</sup> yn,9,12-18:3
30	Δ <sup>6,9,12,15</sup> -18:3	→	Δ <sup>6</sup> yn,9,12,15-18:4

Überraschenderweise weist die Δ<sup>6</sup>-Acetylenase zusätzlich eine cryptische Δ<sup>6</sup>-Desaturaseaktivität auf. In den transgenen Hefen wurden nach Inkorporation exogener Fettsäuresubstrate nicht nur die moostypischen Fettsäuren γ-Linolensäure (Δ<sup>6,9,12</sup>-18:3) und Octadec-6-yn-9,12-(Z,Z)-diensäure (Kohn, 1989), sondern auch die in dieser niederen Pflanze nicht vorkommende Hexadec-6,9-(Z,Z)-diensäure und Octadec-6,9-(Z,Z)-diensäure aus den hefeeigenen Δ<sup>9</sup>-Monoensäuren, sowie Octadec-6,9,12,15-(Z,Z,Z,Z)-tetraensäure und Octadec-6yn-9,12,15-(Z,Z,Z)-triensäure aus inkorporierten Fettsäuresubstraten gebildet.



## Literatur

Asubel F.M., Brent R., Kingston R.E., Moore D.D., Seidman J.G.,  
Smith J.A., Struhl K., Albright L.M., Coen D.M. and Varki A.

- 5 (1995) Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons,  
New York.

- Bossie M.A. and Martin C.E. (1989), Nutritional regulation  
of yeast  $\Delta$ -<sup>9</sup> fatty acid desaturase activity, *J. Bacteriol.* 171,  
10 6409-6413.

Christie W. W. (1998), Mass spectrometry of fatty acids with  
methylene-interrupted ene-yne systems, *Chem. Phys. Lipids* 94,  
35-41.

15

Girke T., Schmidt H., Zähringer U., Reski R. and Heinz E. (1998),  
Identification of a novel  $\Delta^6$ -acyl-lipid-desaturase by targeted  
gene disruption in *Physcomitrella patens*, *Plant J.*, in press.

- 20 Girke T., Sperling P., and Heinz E. (1998), Cloning of desatura-  
ses with new specificities, in 'Advances in lipid research',  
J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo and E. Martínez-Force, Secretario  
de publicaciones de la Universidad de Sevilla, Spain, 103-109.

- 25 Kajiwara S., Shirai A., Fujii T., Toguri T., Nakamura K., and  
Ohtaguchi K. (1996) Polyunsaturated fatty Acid Biosynthesis in  
*Saccharomyces cerevisiae*: Expression of Ethanol Tolerance and the  
*FAD2* Gene from *Arabidopsis thaliana*, *Appl. Environ. Microbiol.*  
62: 4309-4313.

30

Kohn G. (1989), Untersuchungen zum Lipid- und Fettsäurestoff-  
wechsel von *Riccia fluitans* L. und *Ceratodon purpureus* (Hedw.)  
Brid. unter besonderer Berücksichtigung der hochungesättigten  
C18-Acetylenfettsäuren, *Dissertation*, Universität Mainz.

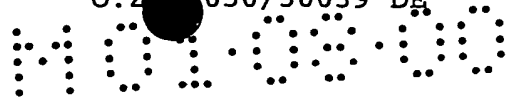
35

Lederer F. (1994) The cytochrome *b*<sub>5</sub>-fold: An adaptable molecule,  
*Biochimie* 76, 674-692.

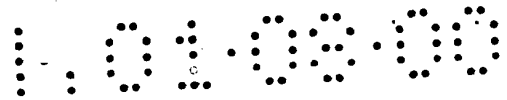
- Lee M., Lenman M., Banás A., Bafor M., Singh S., Schweitzer M.,  
40 Nilsson R., Liljenberg C., Dahlqvist A., Gummesson P.-O., Sjö Dahl  
S., Green A., Stymne S. (1998), Identification of non-heme diiron  
proteins that catalyze triple bond and epoxy group formation,  
*Science* 280, 915-918.

45





- Napier J.A., Sayanova O., Sperling P. and Heinz E. (1999),  
A growing family of cytochrome b<sub>5</sub>-domain fusion proteins, *Trends  
in Plant Science* 4(1), 2-4.
- 5 Pasentsis K., Paulo N., Algarra P., Dittrich P., Thummler F.  
(1998), Characterization and expression of the phytochrome gene  
family in the moss *Ceratodon purpureus*, *Plant J.* 13(1), 51-61.
- Riggs M. G. and McLachlan (1986) A simplified screening procedure  
10 for large numbers of plasmid mini-preparation, *BioTechniques* 4:  
310-313.
- Sayanova O., Smith M.A., Lapinskas P., Stobart A.K., Dobson G.,  
Christie W.W., Shewry P.R., and Napier J.A. (1997) Expression  
15 of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome  
b<sub>5</sub> domain results in the accumulation of high levels of  
 $\Delta^6$ -desaturated fatty acids in transgenic tobacco, *Proc. Natl.  
Acad. Sci. USA* 94: 4211-4216.
- 20 Shanklin J., Whittle E., and Fox B.G. (1994) Eight Histidine  
Residues Are Catalytically Essential in a Membrane-Associated  
Iron Enzyme, Stearoyl-CoA Desaturase, and Are Conserved in  
Alkane Hydroxylase and Xylene Monooxygenase, *Biochemistry* 33:  
12787-12794.
- 25 Sperling P., Zähringer U., and Heinz E. (1998), A sphingolipid  
desaturase from higher plants: Identification of a new cytochrome  
b<sub>5</sub> fusion protein, *J. Biol. Chem.* 273, 28590-28596.
- 30 Von Pein M. (1992), Ph. D. thesis, Heinrich Heine-Universität,  
Düsseldorf.
- Watts J.L. and Browse J. (1999), Isolation and characterization  
of a  $\Delta^5$ -fatty acid desaturase from *Caenorhabditis elegans*, *Arch.*  
35 *Biochem. Biophys.* 362 (1), 175-182.

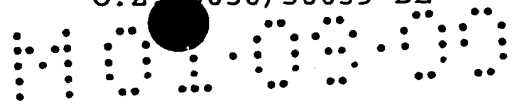


## Legenden

- Abb. 1: Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer1
- 5 Abb. 2: Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer1
- Abb. 3: Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer 3
- Abb. 4: Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer3
- 10 Abb. 5: Partielle Nukleotidsequenz ohne Primer von Cer16
- Abb. 6: Partielle deduzierte Aminosäuresequenz von Cer16
- 15 Abb. 7: Aminosäure-Alignment von Cer1, Cer3 und Cer16 mit Desaturasen und modifizierenden Enzymen, gruppiert in einem Phylogramm nach unterschiedlichen Regioselektivitäten (mit den Programmen CLUSTALX and Treeview). Die Regioselektivitäten sind durch Zahlen markiert (vereinfacht als  $\Delta$ -Desaturasen) und deren Kompartimentierung (PL = plastidär, ER = mikrosomal). Cytochrome  $b_5$ -Fusionsproteine und exotische Modifikationen (Hydroxylierung, Epoxidierung, Acetylierung) werden durch gepunktete bzw. gestrichelte Zweige angezeigt. EMBL Accession numbers (Girke, Sperling und Heinz, 1998).
- 20
- 25
- Abb. 8: Nukleotidsequenz (2003 bp) der  $\Delta 6$ -Acetylenase aus *Ceratodon purpureus* mit 5'- und 3'-untranslatierten Regionen und poly A.
- 30
- Abb. 9: Deduzierte Aminosäuresequenz ( 483 aa) der  $\Delta 6$ -Acetylenase aus *C. purpureus*.
- Abb. 10: Nukleotidsequenz (2142 bp) der  $\Delta 6$ -Desaturase aus
- 35 *C. purpureus* mit 5'- und 3'-untranslatierten Regionen.
- Abb. 11: Deduzierte Aminosäuresequenz (520 aa) der  $\Delta 6$ -Desaturase aus *C. purpureus*.

40

45



Tab. 1: GC-Analysen der Fettsäuremethylester aus transgenen Hefen, die mit dem Leervektor pYES2, der  $\Delta 6$ -Acetylenase (Cer1/pYES2) und der  $\Delta 6$ -Desaturase (Cer3/pYES2) transformiert wurden. Die transgenen Hefezellen wurden ohne  
5 exogenen Fettsäuren ( - ) oder nach Zugabe von Linolsäure (18:2),  $\gamma$ -Linolensäure ( $\gamma$ -18:3),  $\alpha$ -Linolensäure ( $\alpha$ -18:3) oder  $\omega 3$ -Octadecatetraensäure (18:4) analysiert. Fettsäurezusammensetzung in [mol %] der Gesamtfettsäuren, wobei die Inkorporation der gefütterten Fettsäuren  
10 (schwarzer Fettdruck), die Desaturierungsprodukte (in roter Farbe) und die Summe der Desaturierungsprodukte (letzte Zeile) bei den einzelnen Fütterungsversuchen angegeben sind.

15 Abb. 1

CATTCATCATACTGCTCCGAATGAGTGCGACGAACAGTACACACCTCTAG  
ACGAAGACATTGATACTCTCCCATCATTGCCTGGAGCAAGGAAATTTTG  
GCCACCGTTGAGAGCAAGAGAATTTTGGCGAGTGCTTCGATATCAGCACTA  
20 CATGATTCTGCCTCTATTGTTTCATGGCCCGGTACAGTTGGACTTTTGGAA  
GTTTGCTCTTCACATTCAATCCTGATTTGAGCACGACCAAGGGATTGATA  
GAGAAGGGAACAGTTGCTTTTCACTACGCCTGGTTCAGTTGGGCTGCGTT  
CCATATTTTGCCGGGTGTCGCTAAGCCTCTTGCCTGGATGGTAGCAACTG  
AGCTTGTTGGCCGGTTTGTGTTGGGATTCGTGTTTACGTTGAGTCACAAT  
25 GGAAAGGAGGTTTACAATGAATCGAAGGACTTCGTGAGAGCCCAGGTTAT  
TACCACCCGTAACACCAAGCGAGGCTGGTTCAACGATTGGTTCACTGGGG  
GACTCGACACCCAGATTGAG

Abb. 2

30 IHHTAPNECDEQYTPLDEDIDTLPIIAWSKEILATVESKRILRVLQYQHY  
MILPLLFMARYSWTFGSLLFNPDLSSTTKGLIEKGTVAFHAWFSWAAF  
HILPGVAKPLAWMVATELVAGLLLGFFVFTLSHNGKEVYNESKDFVRAQVI  
TTRNTKRGWFNDWFTGGLDTQIE

35

40

45

R 010900

11

Abb. 3

CCTGCATCATGCTGCTCCGAATGAATGCGACCAAAAGTACACGCCGATTG  
ATGAGGATATTGATACTCTCCCCATCATTGCTTGGAGTAAAGATCTCTTG  
5 GCCACTGTTGAGAGCAAGACCATGTTGCGAGTTCTTCAGTACCAGCACCT  
ATTCTTTTTTGGTTCTTTTGACGTTTGCCCGGCGAGTTGGCTATTTTGGA  
GCGCGGCCTTCACTCTCAGGCCCGAGTTGACCCTTGGCGAGAAGCTTTTG  
GAGAGGGGAACGATGGCTTTGCACTACATTTGGTTTAAATAGTGTGCGTT  
TTATCTGCTCCCCGATGGAAACCAGTTGTATGGATGGTGGTCAGCGAGC  
10 TCATGTCTGGTTTTCCTGCTGGGATACGTATTTGTACTCAGTCACAATGGA  
ATGGAGGTGTACAATACGTCAAAGGACTTCGTGAATGCCAGATTGCATC  
GACTCGCGACATCAAAGCAGGGGTGTTTAAATGATTGGTTCACCGGAGGTC  
TCAACAGACAGATT

15 Abb. 4

LHHAAPNECDQKYTPIDEDIDTLPIIAWSKDLLATVESKTMRLRVLQYQHL  
FFLVLLTFARASWLFWSAAFTLRPELTLGEKLLERGTMALHYIWFNSVAF  
YLLPGWKPVVWVSELMSGFLLGYVFVLSHNGMEVYNTSKDFVNAQIAS  
20 TRDIKAGVFNDWFTGGLNRQIE

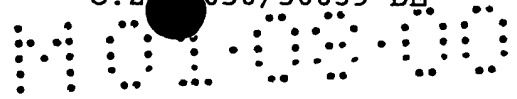
Abb. 5

TGCTCATCACATCGCCTGTAATAGTATAGAATATGATCCAGACCTACAGT  
25 ACATCCCCCTTTTTGCAGTGACATCAAAGCTCTTCTCTAACCTCTACTCC  
TACTTCTATGAAAGGGTTATGCCATTCGATGGCGTAGCACGCTCTCTGAT  
TGCCTACCAGCACTGGACGTTTTATCCAATAATGGCTGTTGCTCGGGTGA  
ACCTCTTTGCCCAATCCCTTCTAGTACTGACCTCGAAGAAGCATGTGCCA  
GACAGGTGGCTTGAGCTCGGTGCTATCGGTTTCTTCTACCTGTGGTTCTT  
30 CACCCTCTTGTCGTACCTGCCCCACTGCACCGGAGAGGCTTGCTTTCGTCC  
TTGTCAGTTTTGCAGTGACAGGGATCCAGCATGTACAGTTTTGCCTGAAC  
CACTTCTCATCGCCGGTTTATCTAGGACAGCCGAAGAGCAAGGCTTGGGT  
TGAATCTCAAGCACGGGGCACTCTCAATCTCTCTACACCGGCTTACATGG  
ATTGGTTTACGGGGGTCTTCAGTTCCAGATCGAG  
35

Abb. 6

AHHIACNSIEYDPLQYIPLFAVTSKLFNSLYSYFYERVMPFDGVARSLI  
AYQHWTFFYPIMAVARVNLFAQSLLVLTSKKHVPDRWLELGAIGFFYLWFF  
40 TLLSYLPTAPERLAFVLVSFAVTGIQHVQFCLNHFSSPVYLGQPKSKAWV  
ESQARGTLNLSTPAYMDWFHGGLOFQIE

45



12

Abb. 7

5

10

15

20

25

30

35

40

45

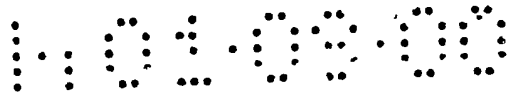


Abb. 8

CTCAGGCAGGTCTCAGTTGATGAGACGCTGAGTTCTGAATCCTTTGAGCT  
GTGTCAGGCTCGGCACTTGTGGGATGGTGAAGGAGTGATCGATCAGGAGT  
5 GCAGGAGCTGCATTAGTTTCTCAGGGTCGATCAGGTTATTCTGAAAAAGG  
CTGCGTCTGTGAGCAGTTTGCAAAAATGGCCCTCGTTACCGACTTTCTGA  
ACTTTCTGGGCACGACATGGAGCAAGTACAGCGTGACACCCATAGCTAT  
GCTGGAAACTATGGGCCTACTTTGAAGCACGCCAAAAAGGTTTCTGCTCA  
AGGTAAAACTGCGGGACAGACACTGAGACAGAGATCGGTGCAGGACAAAA  
10 AGCCAGGCACCTTACTCTCTGGCCGATGTTGCTTCTCACGACAGGCCTGGA  
GACTGCTGGATGATCGTCAAAGAGAAGGTGTATGATATTAGCCGTTTTCG  
GGACGACCACCCTGGAGGGACGGTAATTAGCACCTACTTTGGGCGGGATG  
GCACAGACGTTTTTCGCAACATTCCATCCACCTGCCGCATGGAAGCAACTC  
AATGACTACTACATTGGAGACCTTGCTAGGGAAGAGCCCCTTGATGAATT  
15 GCTTAAAGACTACAGAGATATGAGAGCCGAGTTTGTAGAGAAGGGCTTT  
TCAAGAGTTCCAAGGCCCTGGTTCCTGCTTCAGACTCTGATTAATGCAGCT  
CTCTTTGCTGCGAGCATTTGCGACTATCTGTTACGACAAGAGTTACTGGGC  
TATTGTGCTGTGAGCCAGTTTGATGGGTCTCTTCGTCCAACAGTGTGGAT  
GGCTTGCCCATGATTTCCCTTCATCAACAGGTCTTTGAGAACCGTACCGCG  
20 AACTCCTTCTTTGGCTATTTGTTCCGCAATTGCGTGCTTGGCTTTAGTGT  
ATCATGGTGGAGGACGAAGCACAACTTCATCATACTGCTCCGAATGAGT  
GCGACGAACAGTACACACCTCTAGACGAAGACATTGATACTCTCCCCATC  
ATTGCTTGAGCAAGGAAATTTTGGCCACCGTTGAGAGCAAGAGAATTTT  
GCGAGTGCTTCAATATCAGCACTACATGATTCTGCCTCTATTGTTTCATGG  
25 CCCGGTACAGTTGGACTTTTGGAAAGTTTGCTCTTCACATTCAATCCTGAT  
TTGAGCACGACCAAGGGATTGATAGAGAAGGGAACAGTTGCTTTTCACTA  
CGCCTGGTTTCAGTTGGGCTGCGTTCATATTTTGCCGGGTGTCGCTAAGC  
CTCTTGCGTGATGGTAGCAACTGAGCTTGTGGCCGGTTTGTGTTGGGA  
TTCGTGTTTACGTTGAGTCACAATGGAAAGGAGGTTTACAATGAATCGAA  
30 GGACTTCGTGAGAGCCCAGGTTATTACCACCCGTAACACCAAGCGAGGCT  
GGTTCAACGATTGGTTCACTGGGGGACTCGACACCCAGATTGAGCATCAC  
CTGTTTCCAACAATGCCCAGGCACAACCTACCCCAAGATCGCACCTCAGGT  
CGAGGCTCTTTGCAAGAAGCACGGCCTCGAGTACGATAATGTCTCCGTCG  
TTGGTGCTCTGTGCGGGTTGTGAAGGCGCTCAAGGAAATTGCTGATGAA  
35 GCGTCAATTCCGGCTTCACGCTCACTAAGAAATCGTCGAACTTTGACTATT  
CATTTTTTTTCGCCTGGCTACCTCAAATGTTTCGGGAGCAGGTGCTTGGCAG  
TGTGTTCAACCGGAGCGCACTGAAAATGTGCAGAAATCCATTTCCAGAAAT  
TACCATTCCCTAGCTAAATCTTCTTTTACCAGGTCGGATATATGAAACTT  
TTTTGATGCAACAAGTAGCATTCAATTGAAGACATTGTTCGAGATATAAT  
40 TCGCAGTGTTTCTATTTCAGCGGGCATACTAGTCCATATCGGCGGTT  
GCCGAGAGTTTACATTATTAGTTGGCACAACGAGTAGATCTAGTGTAAT  
TTCTATTTCCGCATGTAATATTACTCTGAATATATACCGTTATCTATTTT  
CCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

NO. 0050

14

Abb. 9

MALVTDFLNF LGTTWSKYSV YTHSYAGNYG PTLKHAKKVS AQGKTAGQTL  
RQRSVQDKKP GTYSLADVAS HDRPGDCWMI VKEKVYDISR FADDHPGGTV  
5 ISTYFGRDGT DVFATFHPPA AWKQLNDYYI GDLAREEPLD ELLKDYRDMR  
AEFVREGLFK SSKAWFLLQT LINAALFAAS IATICYDKSY WAIVLSASLM  
GLFVQQCGWL AHDFLHQQVF ENRTANSFFG YLFGNCVLGF SVSWWRTKHN  
IHHTAPNECD EQYTPLDEDI DTLPIIAWSK EILATVESKR ILRVLQYQHY  
MILPLLFMAR YSWTFGSLLF TFNPDLSTTK GLIEKGTVAF HYAWFSWAAF  
10 HILPGVAKPL AWMVATELVA GLLLGfVFTL SHNGKEVYNE SKDFVRAQVI  
TTRNTKRGWF NDWFTGGLDT QIEHHLFPTM PRHNPKIAP QVEALCKKHG  
LEYDNVSVVG ASVAVVKALK EIADEASIRL HAH

15

20

25

30

35

40

45

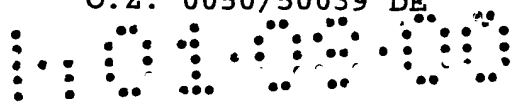


Abb. 10

CGGAG GTCTCTTGTC GTTCTTGGAG  
TCTGTGTCGA GCTTGGAATG CGGTAGGCGC GGCCGTTTCG TGGTTTTGGC  
5 GTTGGCATTG CGCGAGGGCG GACAGTGGGA GTGCGGGAGG TCTGTTTGTG  
CATGACGAGG TGGTTGTAAT CTTGCCCGGC AGAATGGTGT CCCAGGGCGG  
CGGTCTCTCG CAGGGTTCCA TTGAAGAAAA CATTGACGTT GAGCACTTGG  
CAACGATGCC CCTCGTCAGT GACTTCCTAA ATGTCCTGGG AACGACTTTG  
GGCCAGTGGA GTCTTTCCAC TACATTCGCT TTCAAGAGGC TCACGACTAA  
10 GAAACACAGT TCGGACATCT CGGTGGAGGC AAAAAAGAA TCGGTTGCGC  
GGGGGCCAGT TGAGAATATT TCTCAATCGG TTGCGCAGCC CATCAGGCGG  
AGGTGGGTGC AGGATAAAAA GCCGGTACT TACAGCCTGA AGGATGTAGC  
TTCGCACGAT ATGCCCCAGG ACTGCTGGAT TATAATCAAA GAGAAGGTGT  
ATGATGTGAG CACCTTCGCT GAGCAGCACC CTGGAGGCAC GGTTATCAAC  
15 ACCTACTTCG GACGAGACGC CACAGATGTT TTCTCTACTT TCCACGCATC  
CACCTCATGG AAGATTCTTC AGAATTTCTA CATCGGGAAC CTTGTTAGGG  
AGGAGCCGAC TTTGGAGCTG CTGAAGGAGT ACAGAGAGTT GAGAGCCCTT  
TTCTTGAGAG AACAGCTTTT CAAGAGTTCC AAATCCTACT ACCTTTTCAA  
GACTCTCATA AATGTTTCCA TTGTTGCCAC AAGCATTGCG ATAATCAGTC  
20 TGTACAAGTC TTACCGGGCG GTTCTGTTAT CAGCCAGTTT GATGGGCTTG  
TTTATTCAAC AGTGCGGATG GTTGTCTCAC GATTTTCTAC ACCATCAGGT  
ATTTGAGACA CGCTGGCTCA ATGACGTTGT TGGCTATGTG GTCGGCAACG  
TTGTTCTGGG ATTCAGTGTC TCGTGGTGGA AGACCAAGCA CAACCTGCAT  
CATGCTGCTC CGAATGAATG CGACCAAAAAG TACACACCGA TTGATGAGGA  
25 TATTGATACT CTCCCCATCA TTGCTTGGAG TAAAGATCTC TTGGCCACTG  
TTGAGAGCAA GACCATGTTG CGAGTTCTTC AGTACCAGCA CCTATTCTTT  
TTGGTTCTTT TGACGTTTGC CCGGGCGAGT TGGCTATTTT GGAGCGCGGC  
CTTCACTCTC AGGCCCCGAGT TGACCCTTGG CGAGAAGCTT TTGGAGAGGG  
GAACGATGGC TTTGCACTAC ATTTGGTTTA ATAGTGTTGC GTTTTATCTG  
30 CTCCCCGGAT GGAAACCAGT TGTATGGATG GTGGTCAGCG AGCTCATGTC  
TGGTTTCCTG CTGGGATACG TATTTGTACT CAGTCACAAT GGAATGGAGG  
TGTACAATAC GTCAAAGGAC TTCGTGAATG CCCAGATTGC ATCGACTCGC  
GACATCAAAG CAGGGGTGTT TAATGATTGG TTCACCGGAG GTCTCAACAG  
ACAGATTGAG CATCATCTAT TTCCAACGAT GCCCAGGCAC AACCTTAATA  
35 AAATTTCTCC TCACGTGGAG ACTTTGTGCA AGAAGCATGG ACTGGTCTAC  
GAAGACGTGA GCATGGCTTC GGGCACTTAC CGGGTTTTGA AAACACTTAA  
GGACGTTGCC GATGCTGCTT CACACCAGCA GCTTGCTGCG AGTTGAGGCA  
TCGCAGCACT CGTCGAAACA TTTTGTCTG TTATAGTGTT CATATGTGAT  
CGAGGGGAAA AGGTCCCATG CTCTGATCTA TTCTTCTGTA GCCAATATTT  
40 TTCAATTGAA AGGAGGTTCC TCACTTATCT TCCATCTATC GTTGCACATC  
CTGCATCAGA GTTAGCGTTG GAGTAATGTT AAGCACTTGT AGATTATGCC  
CACCATTGCC ACATTTCTGT TCGGTTACAA TCGTTTGATT CCATGCTATC  
CTCCGTGTTT ATCTCGTTGT TATAAGCAAG CTTGAAAAAA CATGCTACGA  
GATTGGCAGA CGTTGTCTTG GCAGCTGTAG AGGTTGGTTC CATTCATTGT  
45 GTAGTACAGA ACTCTCTCGT CCCTGTTTCT CTACATTACT TGTTACATAG  
TGACTTTTCAT TCACAGCAAA AAAAAAAAAA AAAAA



M 0 1 0 0 0 0

16

Abb. 11

MVSQGGGLSQ GSIEENIDVE HLATMPLVSD FLNVLGTTLG QWSLSTTFAF  
KRLTTKKHSS DISVEAQKES VARGPVENIS QSVAQPIRRR WVQDKKPVTY  
5 SLKDVASHDM PQDCWIIKE KVDVSTFAE QHPGGTVINT YFGRDATDVF  
STFHASTSWK ILQNFYIGNL VREEPTLELL KEYRELRALF LREQLFKSSK  
SYLFFKTLIN VSIVATSI AI ISLYKSYRAV LLSASLMGLF IQQCGWLSHD  
FLHHQVFETR WLNDVVG YV GNVVLGFSVS WWKTKHNLHH AAPNECDQKY  
TPIDEDIDTL PIIAWSKDLL ATVESKTMLR VLQYQHLFFL VLLTFARASW  
10 LFWSAFTLR PELTLGEKLL ERGTMALHYI WFNSVAFYLL PGWKPVVWMV  
VSELMGFL L GYVFVLSHNG MEVYNTSKDF VNAQIASTRD IKAGVFNDWF  
TGGLNRQIEH HLFPTMPRHN LNKISPHVET LCKKHGLVYE DVSMASGTYR  
VLKTLKDVAD AASHQQLAAS

15

20

25

30

35

40

45

Tab. 1

Fatty acids [mol %]	pYES2				Cer1/pYES2				Cer3/pYES2						
	—	18:2	$\gamma$ -18:3	$\alpha$ -18:3	18:4	—	18:2	$\gamma$ -18:3	$\alpha$ -18:3	18:4	—	18:2	$\gamma$ -18:3	$\alpha$ -18:3	18:4
16:0	26.2	24.1	27.8	27.4	32.7	24.2	23.1	26.2	25.7	26.5	26.5	23.3	28.1	29.2	29.6
16:1 <sup>9</sup>	41.8	9.6	27.4	27.3	16.1	36.5	13.3	24.7	28.8	21.9	43.8	9.9	25.2	34.0	20.9
16:2 <sup>6,9</sup>						6.9	1.8	3.3	5.3	3.0	1.1		0.1	0.8	0.1
18:0	6.5	5.3	6.1	6.1	7.9	6.4	6.1	6.6	6.5	7.1	5.5	5.3	6.3	5.8	5.9
18:1 <sup>9</sup>	23.6	4.9	15.1	14.8	11.3	24.9	8.8	15.6	20.0	16.8	21.4	5.3	15.7	14.3	11.5
18:2 <sup>6,9</sup>						0.3		0.2	0.3	0.2	0.1			0.1	
18:2 <sup>9,12</sup>	53.9					41.9						42.3			
18:3 <sup>6,9,12</sup>			19.5			0.8		16.1				8.1	21.2		
18:3 <sup>9,12,15</sup>			22.8						10.0					11.9	
18:4 <sup>6,9,12,15</sup>					28.8				1.7	21.3				1.9	30.1
18:3 <sup>6yn,9,12</sup>						1.3		4.6							
18:4 <sup>6yn,9,12,15</sup>										2.3					
$\Sigma$ Des. [mol %]	—	—	—	—	—	7.2	3.9	8.1	7.3	5.5	1.2	8.1	0.1	2.8	0.1

4.01.08.00

## Patentansprüche

1. Protein enthaltend die in Abb. 2 dargestellte Aminosäure-  
5 sequenz.
2. Protein enthaltend die in Abb. 4 dargestellte Aminosäure-  
sequenz.
- 10 3. Protein enthaltend die in Abb. 6 dargestellte Aminosäure-  
sequenz.
4. Verwendung von Proteinen nach Anspruch 1 bis 3 zur Her-  
stellung von ungesättigten Fettsäuren.
- 15 5. Verfahren zur Herstellung von ungesättigten Fettsäuren, indem  
man gesättigte Fettsäuren mit mindestens einem der Proteine  
gemäß Anspruch 1 bis 3 inkubiert.

20

25

30

35

40

No 100000

$\Delta^6$ -Acetylenase und  $\Delta^6$ -Desaturase aus *Ceratodon purpureus*

Zusammenfassung

5

Die Erfindung betrifft neue Delta-6 Acetylenasen und -Desaturasen und deren Verwendung.

10

15

20

25

30

35

40

45